

DIALOG(R) File 351:DERWENT WPI  
(c)1998 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

004749423

WPI Acc No: 86-252764/198639

XRAM Acc No: C86-108938

Stabilising xanthine oxidase by immobilising - at water-repellent carrier  
esp. porous, bead-shaped crosslinked polystyrene resin chemically  
modified with amino Gps.

Patent Assignee: BAYER AG (FARB )

Inventor: EGERER P; SCHMIDTKAS G

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Week
DE 3508906	A	19860918	198639 B

Local Applications (No Type Date): DE 3508906 A 19850313

Priority Applications (No Type Date): DE 3508906 A 19850313

Abstract (Basic): DE 3508906 A

Xanthine oxidase is immobilised at a carrier having a  
water-repellent surface.

A porous matrix is prefd.. Catalysts in bead form are partic.  
useful for bio-catalysis. The carrier matrix is esp. a crosslinked  
polystyrene resin, which is chemically modified and bears amino gps..  
Pref. (a) the xanthine oxidase is bonded adsorptively or ionically at  
the water-repellent carrier and then treated with bi- or polyfunctional  
crosslinking agents. (b) The xanthine oxidase is bonded covalently to  
chemically modified polystyrene-based carriers. (c) The xanthine  
oxidase is bonded to a polystyrene-based carrier bearing amino gp.. (d)  
The amino gp.-bearing carrier matrix is activated with glutaraldehyde,  
followed by covalently bonding the xanthine oxidase. (e)  
Superoxide-dismutase and/or catalase can be co-immobilised with the  
xanthine oxidase.

USE/ADVANTAGE - The immobilised xanthine-oxidase is useful as a  
bio-catalyst or as a bio-sensor (claimed). Immobilisation on a  
water-repellent carrier surface increases stability esp. under  
conditions of continuous catalysis.

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑪ **DE 3508906 A1**

⑤1 Int. Cl. 4:  
**C12N 9/02**  
C12N 11/08

②1 Aktenzeichen: P 35 08 906.7  
②2 Anmeldetag: 13. 3. 85  
④3 Offenlegungstag: 18. 9. 86

DE 3508906 A1

⑦1 Anmelder:  
Bayer AG, 5090 Leverkusen, DE

⑦2 Erfinder:  
Egerer, Peter, Dr.; Schmidt-Kastner, Günter, Prof.  
Dr., 5600 Wuppertal, DE

⑤4 Verfahren zur Stabilisierung von Xanthin Oxidase durch Immobilisierung an hydrophoben Trägerharzen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung von Xanthin Oxidase an Trägerharzen mit hydrophoben Eigenschaften und die Verwendung dieser Präparate als Biokatalysatoren zu präparativen oder zu analytischen Zwecken (Biosensoren). Die erfindungsgemäß erhaltenen Präparate besitzen eine wesentlich verbesserte Stabilität insbesondere unter Bedingungen der kontinuierlichen Katalyse.

DE 3508906 A1

DE 3508906 A1

DE 3508906 A1

5 Patentansprüche

1. Verfahren zur Immobilisierung von Xanthin Oxidase,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Xanthin Oxidase an  
einen Träger mit hydrophober Oberfläche immobili-  
siert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die hydrophobe Trägermatrix porös ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die hydrophobe Trägermatrix in Perl-  
form vorliegt.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die hydrophobe Trägermatrix ein ver-  
netztes Polystyrolharz ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß die hydrophobe Trägermatrix  
chemisch modifiziert ist.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß die hydrophobe Trägermatrix  
Aminogruppen trägt.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, dadurch  
gekennzeichnet, daß die Xanthin Oxidase adsorptiv  
oder ionisch an hydrophobe Träger gebunden und  
anschließend mit bi- oder polyfunktionellen Ver-  
netzungsmitteln behandelt wird.

- 5    8.    Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Xanthin Oxidase an chemisch modifizierte Träger auf Polystyrolbasis kovalent gebunden wird.
- 10   9.    Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Xanthin Oxidase an einen Träger auf Polystyrolbasis gebunden wird, der Aminogruppen trägt.
- 15   10.    Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminogruppen tragende Trägermatrix mit Glutaraldehyd aktiviert wird und anschließend die Xanthin Oxidase kovalent gebunden wird.
- 20   11.    Verfahren nach Anspruch 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß Superoxid-Dismutase und/oder Katalase mit Xanthin Oxidase co-immobilisiert werden.
- 25   12.    Verfahren zur Stabilisierung von Xanthin Oxidase, dadurch gekennzeichnet, daß die Xanthin Oxidase an einem Träger mit hydrophober Oberfläche nach Anspruch 1 bis 11 immobilisiert wird.
- 30   13.    Verwendung der nach Anspruch 1 bis 11 immobilisierten Xanthin Oxidase als Biokatalysatoren oder Biosensoren.

35

5 BAYER AKTIENGESELLSCHAFT 5090 Leverkusen, Bayerwerk  
Konzernverwaltung RP  
Patentabteilung Bu/Ke-c

10

Verfahren zur Stabilisierung von Xanthin Oxidase durch  
Immobilisierung an hydrophoben Trägerharzen

15 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Immobilisierung  
von Xanthin Oxidase an Trägerharzen mit hydrophoben  
Eigenschaften und die Verwendung dieser Präparate als  
Biokatalysatoren zu präparativen oder zu analytischen  
20 Zwecken (Biosensoren). Die erfindungsgemäß erhaltenen  
Präparate besitzen eine wesentlich verbesserte Stabili-  
tät insbesondere unter Bedingungen der kontinuierlichen  
Katalyse.

Die Bedeutung von Enzymen in der Analytik, zur präpara-  
25 tiven Synthese von Grammengen wertvoller, sonst schwer  
zugänglicher Chemikalien, und im industriellen Maßstab  
zur Herstellung von Zwischen- oder Endprodukten, wie  
z.B. 6-Aminopenicillansäure, ist in den letzten Jahren  
immer größer geworden. Insbesondere für präparative  
30 Techniken werden die Enzyme bevorzugt in immobilisierter  
Form eingesetzt. Eine industrielle Anwendung aber setzt  
eine genügende Langzeit-Stabilität des Biokatalysators  
voraus. Während bei immobilisierten Hydrolasen oder Iso-  
merasen ohne weiteres Betriebszeiten von mehreren Mona-  
35 ten bis zu zwei Jahren zu erzielen sind, scheitert die  
industrielle Anwendung v n Oxidoreduktasen häufig an

- 2 -  
- 4.

5 mangelnder Stabilität. Insbesondere Oxidoreduktasen mit komplexen, proteingebundenen Cofaktorsystemen, beispielsweise Hydrogenasen, Dehydrogenasen oder Oxidasen werden unter Bedingungen des kontinuierlichen Umsatzes rasch inaktiviert.

10

Die Xanthin Oxidase ist ein konjugiertes Molybdän-Eisen-Schwefel-Flavoprotein, das die Oxidation von Xanthin zu Harnsäure mit Hilfe von molekularem Sauerstoff oder künstlichen Elektronenakzeptoren wie z.B. Ferri-  
15 cyanid katalysiert. Dieses Enzym weist eine geringe Substratspezifität auf. So wird die Oxidation verschiedenster Azaheterozyklen oder auch die Oxidation von Aldehyden zu Carbonsäuren katalysiert - vgl. van der Plas et al. (1984) in: Innovations in Biotechnology,  
20 eds. Houwink, E.H., van der Meer, R.R., Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, S. 93-101, oder Pelsy, G., Klibanov, A.M. (1983) Biochem. Biophys. Acta 742, 352-357; geben darüber hinaus noch einen Überblick über Immobilisierungen in hydrophilen Trägern.

25

Die Xanthin Oxidase zeichnet sich vor allem durch ihre hohe Regiospezifität aus und kann daher für den präparativen Chemiker ein wertvoller Biokatalysator sein.

30

Die Halbwertszeit der Aktivität immobilisierter Präparate von Xanthin Oxidase aus Milch liegt unter Bedingungen der kontinuierlichen Katalyse bei etwa maximal 24 h. Durch Zusatz von Superoxid Dismutase und Katalase zum Schutz vor Inaktivierung durch  $H_2O_2$  oder durch

35

5 Superoxid-Radikalanion gelingt es, die Halbwertszeit etwa zu verdoppeln. In gefriergetrockneten Buttermilchpräparaten, immobilisiert in Gelatine, besitzt die Xanthin Oxidase eine Halbwertszeit von etwa 5 Tagen.

10 Für industrielle Zwecke sind jedoch diese Standzeiten unzureichend und kostenungünstig.

Desweiteren kann Xanthin Oxidase als analytisches Hilfsmittel eingesetzt werden. Beispielsweise lassen sich die  
15 Hypoxanthin- und Inosin-Konzentrationen in Fisch oder Fischprodukten mittels eines Enzymsensorsystems bestimmen. Dabei werden Xanthin Oxidase und Nukleosid Phosphorylase in einer Membran coimmobilisiert (Watanabe et al (1984) Appl. Microbiol. Biotechnol. 19, 18-22;  
20 Karube et al. (1984) J.Agric. Food Chem. 32, 314-319).

Es wurde nun ein Verfahren zur Stabilisierung von Xanthin Oxidase gefunden, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Xanthin Oxidase an eine hydrophobe Trägermatrix immobilisiert wird.  
25

Bevorzugt sind hydrophobe Trägermaterialien auf Polystyrolbasis. Für die Herstellung von Biosensoren sind Membranen und Folien besonders geeignet, während für Biokatalysatoren Träger in Perlforn bevorzugt werden. Vorteilhaft ist die Verwendung von porösen Trägern, da bei solchen eine größere Oberfläche für die Immobilisierung der Xanthin Oxidase zur Verfügung steht. Besonders geeignet sind handelsübliche oder chemisch modifizierte Ionenaustauscherharze.  
30  
35

5 Beispielsweise eignen sich die Produktgruppen Diaion<sup>®</sup>,  
Amberlite<sup>®</sup>, Dowex<sup>®</sup>, Ionac Relite<sup>®</sup>, Lewatit<sup>®</sup>, Duolite<sup>®</sup>,  
Zerolit<sup>®</sup>, Imac<sup>®</sup>.

10 Die Xanthin Oxidase kann zuerst ionisch oder adsorptiv  
gebunden werden und nachträglich mit einem üblichen Ver-  
netzungsmittel wie z.B. Glutaraldehyd fixiert werden.

15 Besonders vorteilhaft ist die kovalente Bindung der  
Xanthin Oxidase an modifizierte Polystyrolharze, die  
freie Aminogruppen tragen. Die freien Aminogruppen  
werden zuerst mit Glutaraldehyd analog dem aus der  
Literatur bekannten Verfahren bei Aminoalkyl-Glas (z.B.  
Aminoalkyl-CPG<sup>®</sup>) modifiziert und der so erhaltene  
Glutaraldehyd-modifizierte Träger mit der Enzymlösung  
20 inkubiert (vgl. Beispiele).

Die so erhaltenen immobilisierten Xanthin Oxidase Präpa-  
rate wurden zur Oxidation von 3-Nitrobenzaldehyd zu  
3-Nitrobenzoesäure eingesetzt. Sie weisen wesentlich  
25 längere Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$ ) unter katalytischen  
Bedingungen auf als Xanthin Oxidase Präparate, die durch  
vergleichbare Immobilisierungsverfahren an Glutaralde-  
hyd-aktivierte hydrophile Aminoalkyl-Träger, wie z.B.  
CPG<sup>®</sup>, Silikate, wie z.B. Promaxon<sup>®</sup> hergestellt werden  
30 (siehe Tabelle 1).

Die Halbwertszeiten für Lewatit<sup>®</sup>-gebundene Xanthin  
Oxidase lagen bei etwa 10 Tagen im Vergleich zu wenigen  
Stunden für CPG<sup>®</sup>- oder Promaxon<sup>®</sup>-gebundene Xanthin  
35 Oxidase.



5 Vergleichbar zu in Gelatine immobilisierten g frier-  
getrocknetem Milchpulver ( $t_{1/2}$  Xanthin Oxidase etwa  
120 h) wurde an hydrophoben Trägerharzen eine Halbwert-  
zeit von > 10 d beobachtet. Somit zeigen die erfindungs-  
gemäßen Präparate eine wesentlich bessere Stabilität als  
10 das freie Enzym bzw. in hydrophilen Trägern immobili-  
sierte Präparate.

Die erfindungsgemäß an hydrophoben Trägerharzen  
immobilisierte Xanthin Oxidase kann als Biokatalysator  
15 zu Biotransformationen oder als Enzymsensor für ana-  
lytische Zwecke wiederholt eingesetzt werden.

Die in den nachstehenden Beispielen verwendete Xanthin  
Oxidase aus Kuhmilch ist handelsüblich oder wurde selbst  
20 isoliert. Die Isolierung kann nach verschiedenen bekann-  
ten Methoden durchgeführt werden:

a) durch proteolytische, lipolytische Enzyme und  
organische Reagentien (vgl. Avis, P.G. et al.  
25 (1955) J. Chem. Soc. 1100; Massey, V. et al (1972)  
Biochem. J. 127, 10; Gilbert, D.A., Bergel, F.  
(1964) Biochem. J. 90, 350),

b) nicht-proteolytisch durch milde chemische Reagen-  
30 tien (vgl. Zikakis, J.P., Silver, M.R. (1984)  
J. Agric. Food Chem. 32, 340-343).

Im Handel ist die Xanthin Oxidase in Form einer Suspen-  
sion in Ammoniumsulfat z.B. von Boehringer Mannheim  
35 (FRG) oder Sigma Chemical Co. (USA) erhältlich.

5 Handelsübliche Präparate wurden vor d r Verwendung  
zuerst zentrifugiert, das Xanthin Oxidase Präzipitat in  
0.1 M Kaliumphosphat pH 7,4 aufgenommen und bei +4°C  
gegen den gleichen Puffer dialysiert. Die so erhaltenen  
Xanthin Oxidase Lösungen wurden direkt für die Immobi-  
10 sierungen verwendet.

An hydrophile Trägermatrizen gebundene Xanthin Oxidase  
ist unter Katalysebedingungen wesentlich instabiler als  
an hydrophobe Träger immobilisiertes Enzym, wie die  
15 folgenden Beispiele deutlich zeigen.

Die Herstellungsverfahren der immobilisierten Präparate  
nach 1 a-c) sind untereinander vergleichbar und wurden  
ausgearbeitet in Anlehnung an literaturbekannte Ver-  
20 fahren für poröses Glas.

25

30

35

5 Beispiel 1

Immobilisierung von Xanthin Oxidase an Lewatit<sup>®</sup> MP64ZII,  
an Controlled Pore Glass<sup>®</sup> und an Promaxon<sup>®</sup>.

10 1a) Immobilisierung an Lewatit<sup>®</sup> MP64ZII

2,5 g Lewatit MP64ZII wurden in 25 ml 0.1 M  
Tris.HCl, pH 8,0 aufgenommen, nach Zugabe von 5 ml  
25 % Glutaraldehyd (Fa. Merck) am Wasserstrahlvakuum für 10 min. entgast und 24 h bei +4°C auf einem  
15 Schüttelinkubator inkubiert.

Danach wurden die Harzperlen abgesaugt und mit  
insgesamt 1 l H<sub>2</sub>O portionsweise gewaschen.

20

50 mg der dialysierten Xanthin Oxidase-Lösung  
(1 U/mg, Fa. Boehringer Mannheim) in 60 ml 0.1 M  
Tris.HCl, pH 8,0, wurden mit 2,5 g Glutaraldehyd-  
modifiziertem Lewatit<sup>®</sup> MP64ZII nach 10-minütigem  
25 Entgasen am Wasserstrahlvakuum für 72 h bei +4°C  
auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Der Über-  
stand enthielt noch 23 mg Restprotein. Die Harz-  
perlen mit der gebundenen Xanthin Oxidase wurden  
portionsweise mit 1 l kaltem 0.1 M Kaliumphosphat-  
30 puffer, pH 7,4, gewaschen und das immobilisierte  
Präparat im gleichen Puffer bei +4°C gelagert.

35

- 8 -

- 10 -

## 5 1b) Immobilisierung an Promaxon®

Gemäß der Herstellervorschrift für Aminopropyl-Glas wurde zunächst Aminopropyl-Promaxon® hergestellt. Hierzu wurden 8,7 g Calcium-freies Promaxon® mit 4 ml gamma-Aminopropyltriethoxysilan in 140 ml Toluol für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, danach das Toluol abgesaugt, der Rückstand portionsweise mit 1 l Aceton gewaschen und im Trockenschrank bei 100°C getrocknet.

15 7,9 g des so hergestellten Aminopropyl-Promaxon® werden in 100 ml 0.1 M Natriumphosphat, pH 7,0, mit 20 ml 25 % Glutaraldehyd (Fa. Merck) nach kurzem Entgasen an der Wasserstrahlpumpe für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, nach Absaugen des Überstandes mit 1 l H<sub>2</sub>O portionsweise gewaschen und an der Luft getrocknet.

25 1 g des so hergestellten Glutaraldehyd-aktivierten Aminopropyl-Promaxon® wurden mit 50 mg Xanthin Oxidase (1 U/mg, Fa. Boehringer Mannheim) in 100 ml 0,05 M Tris.HCl, pH 8,0 nach Entgasen an der Wasserstrahlpumpe für 18 h bei 4°C inkubiert. Nach dem Absaugen des proteinfreien Überstandes wurde das Präparat portionsweise mit 1 l 0.1 M Kaliumphosphat pH 7,4 gewaschen und im gleichen Puffer als Suspension bei 4°C gelagert.

30

35

- 9 -

M-

- 5 1c) Immobilisierung an Controlled Pore Glass<sup>®</sup>  
48,14 g CPG-Glass, 530 A (Fa. Serva, Heidelberg  
120-200 mesh) wurden in 700 ml 5 %  $\text{HNO}_3$  für 2 h bei  
Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die Glas-  
perlen abgesaugt und mit 8 l  $\text{H}_2\text{O}$  portionsweise ge-  
waschen, bis kein  $\text{HNO}_3$  mehr nachweisbar war, und  
10 über Nacht bei 100°C getrocknet.  
46,5 g so gereinigtes CPG-Glas wurden in 700 ml  
Toluol p.A. und 22 ml gamma-Aminopropyltriethoxy-  
silan für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt, an-  
schließend abgesaugt, mit 5 l Aceton portionsweise  
15 gewaschen und über Nacht bei 100°C getrocknet.
- 43,8 g des so erhaltenen Aminopropyl-Glases wurden  
in 100 ml 0.1 M Natriumphosphat, pH 7,0, mit 20 ml  
20 25 % Glutaraldehyd-Lösung kurz an der Wasserstrahl-  
pumpe entgast, dann 2 h bei Raumtemperatur geschüt-  
telt. Nach Absaugen des Überstandes wurden die  
Glasperlen portionsweise mit insgesamt 8 l  $\text{H}_2\text{O}$   
gewaschen und an der Luft getrocknet.
- 1 g des so hergestellten Glutaraldehyd-aktivierten  
Aminopropyl-Glases wurden mit 50 mg Xanthin Oxidase  
(1 U/mg, Fa. Boehringer, Mannheim) in 100 ml 0.05 M  
Tris.HCl, pH 8,0, nach Entgasen an der Wasser-  
strahlpumpe für 18 h bei 4°C inkubiert. Nach dem  
Absaugen des proteinfreien Überstandes wurden die  
Glasperlen portionsweise mit 2 l 0.1 M Tris.HCl,  
pH 7,4, gewaschen und im gleichen Puffer bei 4°C  
gelagert.
- 35

- 10 -

12.

5 1d) Stabilitätsvergleich der Präparate 1a-1c unter Katalysebedingungen - Oxidation von 3-Nitrobenzaldehyd zu 3-Nitrobenzoesäure mit  $O_2$  als Elektronenakzeptor.

10 1 g des Präparats 1a (etwa 9,5 mg Xanthin Oxidase an Lewatit<sup>®</sup> gebunden), 200 mg des Präparats 1b (10 mg Xanthin Oxidase an Promaxon<sup>®</sup> gebunden), 200 mg des Präparats 1c (10 mg Xanthin Oxidase an CPG gebunden) wurden jeweils in verschiedenen Batch-Ansätzen unter  
15 Schütteln bei 25°C wie folgt inkubiert:

10 ml 0.1 M Tris.HCl, pH 7,4, 1mM 3-Nitrobenzaldehyd,  
10 % Methanol.

20 Nach jeweils etwa 90 % Substratumsatz (3-Nitrobenzaldehydkonzentration unter 10 % des Ausgangswertes) wurde der Biokatalysator mit Puffer gewaschen und mit frischer Reaktionslösung versetzt und erneut inkubiert.

25 In Abb. 1 sind die gemessenen Initialgeschwindigkeiten der Präparate 1a-1c gegen die Anzahl der Ansätze aufgetragen.

Das Lewatitpräparat 1a wies auch nach dem 10. Wiederholungsansatz etwa 90 % Restaktivität auf, während das  
30 Promaxon- und das Glaspräparat schon im 2. bzw. 3. Wiederholungsansatz inaktiv waren.

35

- 11 -

13.

5 Beispiel 2

Immobilisierung von Xanthin Oxidase an Diaion® HP 20  
durch Adsorption und Vernetzung mit Glutaraldehyd.

- 10 Aus Buttermilch nach Gilbert und Bergel (1964) gerei-  
nigte Xanthin Oxidase 0,24 U/mg (Xanthin als Substrat)  
wurde gegen 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7,4, dialysiert.  
50 ml dieses dialysierten Präparats (2,70 mg/ml) wurden  
langsam über eine mit gleichem Puffer vorbehandelte  
15 Säulenpackung von 2 g Diaion® HP 20 (Fließrate geringer  
als 10 ml/h) rezirkulierend gepumpt, bis die Proteinkon-  
zentration des Eluats auf 1,95 mg/ml abgenommen hatte.  
Die Differenz zur eingesetzten Menge von etwa 37,5 mg  
Protein war somit adsorptiv am Diaion® HP 20 gebunden  
20 worden. Nun wurden dem Eluat 2 ml 25 % Glutaraldehyd-  
Lösung zugesetzt und rezirkulierend für 16 h über die  
Diaion®-Säule gepumpt. Alle Vorgänge wurden bei +4°C  
durchgeführt. Die Proteinkonzentration des Eluats nahm  
dadurch auf 1,42 mg/ml ab, was einer Beladung von etwa  
25 32 mg Protein/g Diaion® HP 20 entspricht. In Abb. 2 ist  
wie in Abb. 1 die Aktivität in % gegen die Anzahl der  
durchgeführten Inkubationen aufgetragen.

30

35

- 12 -

14-

5 Beispiel 3

Immobilisierung von Xanthin Oxidase an Glutaraldehyd-aktiviertes Lewatit MP64ZII nach vorheriger Behandlung des Harzes mit 3-Nitrobenzaldehyd.

10

Glutaraldehyd-aktiviertes Lewatit MP64ZII absorbierte in einem Versuch etwa 25 mg 3-Nitrobenzaldehyd pro Gramm Harz.

- 15 25 g des mit 3-Nitrobenzaldehyd belegten Harzes wurden in einer Mischung aus 50 ml Dialysat Xanthin Oxidase (4,4 mg/ml) und 150 ml Tris.HCl, pH 7,4, nach Entgasen an der Wasserstrahlpumpe bei +4°C für 72 h geschüttelt. Von den eingesetzten 220 mg Protein waren noch 32 mg im
- 20 Überstand nachweisbar.

- 1 g dieses Xanthin Oxidase Präparats wurden wiederholt batchweise in 10 ml 0.1 M Tris.HCl, pH 7,4, 1 mM 3-Nitrobenzaldehyd, 10 % Methanol, bei 25°C unter
- 25 Schütteln inkubiert.

In Abb. 3 ist die Aktivität in % gegen die Anzahl der durchgeführten Inkubationen aufgetragen.

- 30 In allen vorstehenden Beispielen erfolgte die Analyse von 3-Nitrobenzaldehyd und 3-Nitrobenzoesäure per HPLC (Säule RPC<sub>18</sub>, Laufmittel 50 % Acetonitril, 0,5 % Ameisensäure, 49,5 % Wasser).

35



- 15 -

- 15 -

5 Tabelle 1

Halbwertszeiten immobilisierter Xanthin Oxidase  
Präparate (gemäß Beispiele 1 bis 3) unter Katalyse-  
bedingungen.

10 Substrat: 3-Nitrobenzaldehyd, Luftsauerstoff als  
Elektronenakzeptor.

Träger	Halbwertszeit $t_{1/2}$	Beispiel
15	<hr/>	
Lewatit <sup>®</sup> MP64ZII, Glutaraldehyd-modifiziert	> 12 d	1a
20	Promaxon <sup>®</sup> , nach Modifizierung mit $\gamma$ -Aminopropyltriethoxy- silan und Glutaraldehyd	< 1 d
Controlled-Pore Glass <sup>®</sup> , nach Modifizierung mit $\gamma$ -Aminopropyl- triethoxysilan	< 1 d	1c
25	Diaion <sup>®</sup> HP 20, nach Adsorption und Vernetzung mit Glutaralde- hyd	> 25 d
30	Lewatit <sup>®</sup> MP64ZII, Glutaraldehyd- modifiziert, nach Sättigung mit 3-Nitrobenzaldehyd	> 25 d
		3

35

Legende zu den Abbildungen 1-3



5

Abb. 1:

Vergleich Stabilität verschiedener immobilisierter Xanthin Oxidase-Präparate unter Katalysebedingungen.

2 Ansätze pro Tag: 1mM 3-Nitrobenzaldehyd, 10 % MeOH,  
10 aerob ( $O_2$  als Elektronenakzeptor), 0.1 M K-Phosphat, pH 7.4, 25°C.

● ● Xanthin Oxidase an Lewatit MP64 ZII immobilisiert  
(1a)

15   Xanthin Oxidase an Promaxon® immobilisiert (1b)  
X " " an CPG® immobilisiert (1c)

Aufgetragen ist die Restaktivität in % (Ordinate) gegen die Zahl der durchgeführten Inkubationen bzw. Wiederholungsansätze (Abszisse).

20

Abb. 2:

Stabilität der nach Beispiel 2 an Diaion® MP 20 immobilisierten Xanthin Oxidase unter Katalysebedingungen. 1

25 Ansatz pro Tag, 1mM 3-Nitrobenzaldehyd, 10 % Methanol, 0,1 M K-Phosphat, pH 7.4, 25°C.

Es wurde die gleiche Auftragung wie in Abb. 1 gewählt.

Abb. 3:

30 Stabilität der nach Beispiel 3 an Lewatit MP 64 ZII immobilisierten Xanthin Oxidase unter Katalysebedingungen. 1 Ansatz pro Tag, 1mM 3-Nitrobenzaldehyd, 10 % Methanol, 0.1 M K-Phosphat, pH 7.4, 25°C.

35 Es wurde die gleiche Auftragung wie in Abb. 1 gewählt.

-17-

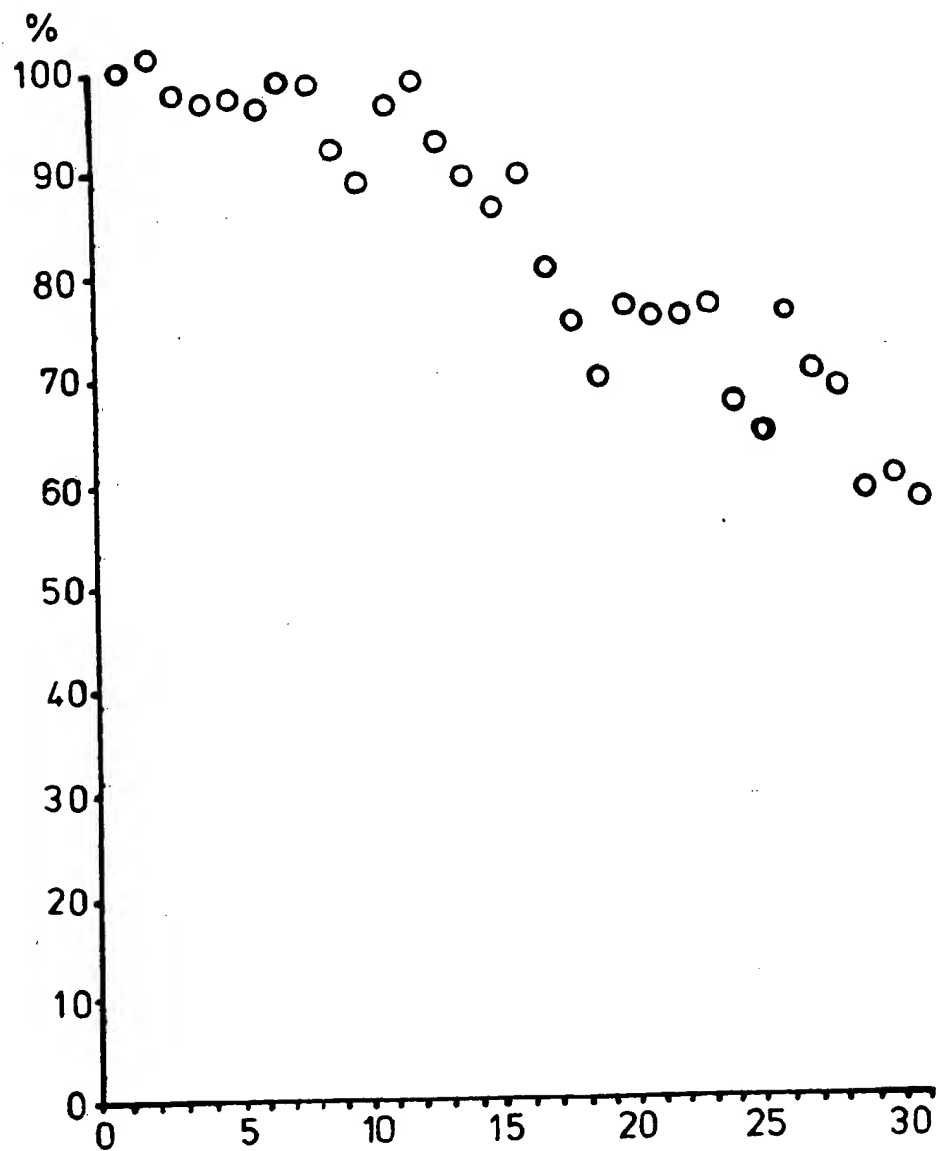


FIG. 2

- 18 -

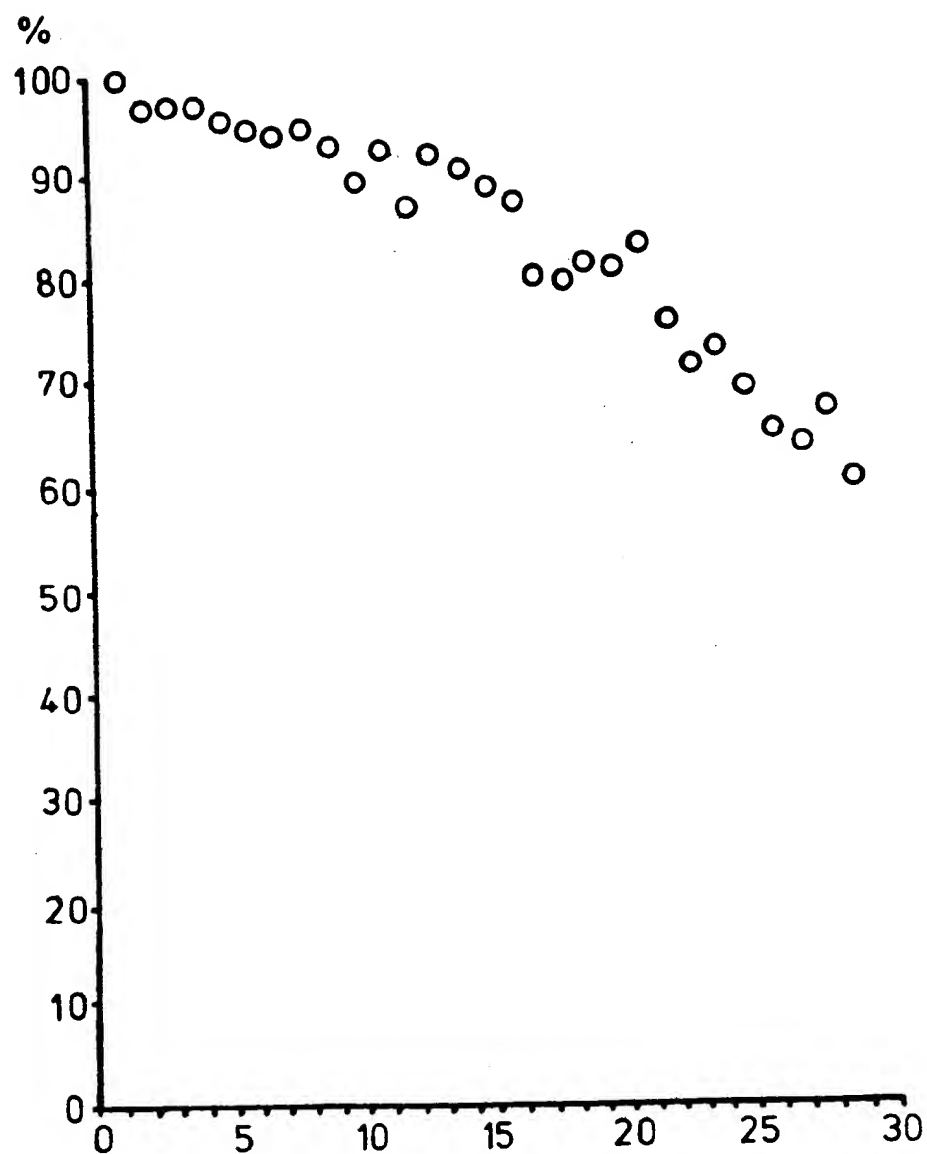


FIG. 3

ORIGINAL INSPECTED

3508906

- 19 -

Nummer:  
Int. Cl. 4:  
Anmeldetag:  
Offenlegungstag:

35 08 906  
C 12 N 9/02  
13. März 1985  
18. September 1986

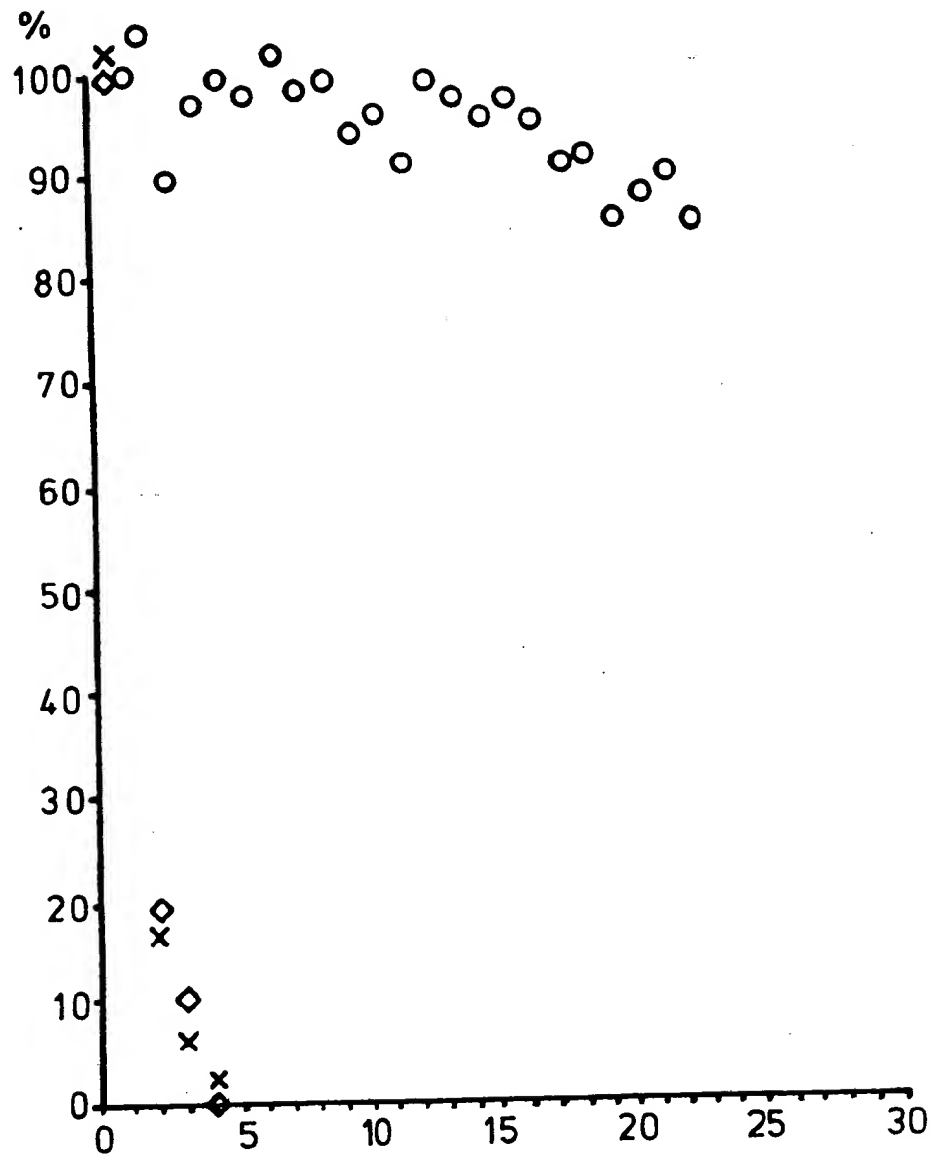


FIG. 1